

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 5 月 17 日 (17.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/34828 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 21/06 [JP/JP]. 江尻昌宏 (EJIRI, Masahiro) [JP/JP]; 〒229-0006 神奈川県相模原市淵野辺5-11-10 カルピス株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/07930
- (22) 国際出願日: 2000 年 11 月 10 日 (10.11.2000) (74) 代理人: 弁理士 酒井 一, 外 (SAKAI, Hajime et al.); 〒102-0083 東京都千代田区麹町5丁目7番地 秀和紀尾井町TBRビル Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (30) 優先権データ:  
特願平 11/321084  
1999 年 11 月 11 日 (11.11.1999) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): カルピス株式会社 (CALPIS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒150-0021 東京都渋谷区恵比寿西2丁目20番3号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山本直之 (YAMAMOTO, Naoyuki) [JP/JP]. 上野敬太 (UENO, Keita)

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING TRIPEPTIDES

(54) 発明の名称: トリペプチドの製造方法

(57) Abstract: A process for efficiently, easily and stably producing tripeptides Val Pro Pro and Ile Pro Pro, which are useful as hypotensive drugs, anti-stress drugs, etc., by an enzymatic method. This process involves the step of cleaving a milk casein-containing material with a proteinase to form an intermediate peptide selected from the group consisting of a peptide containing the sequence Val Pro Pro but having no Pro other than this sequence, a peptide containing the sequence Ile Pro Pro but having no Pro other than this sequence and a mixture of these peptides and then cleaving the intermediate peptide with a peptidase to thereby give at least one of the tripeptides Val Pro Pro and Ile Pro Pro.

(57) 要約:

血圧降下剤、抗ストレス剤等として有用なトリペプチド Val Pro Pro、Ile Pro Pro を、酵素法により、収率良く、容易に、且つ安定的に製造する方法であって、この製造方法は、乳カゼインを含む材料を、乳カゼインを含む材料を、プロテイナーゼにより切断し、配列 Val Pro Pro を含み、且つこの配列以外に Pro を含まないペプチド、配列 Ile Pro Pro を含み、且つこの配列以外に Pro を含まないペプチド及びこれらの混合物からなる群より選択される中間体ペプチドを生成させ、前記中間体ペプチドをペプチダーゼにより切断し、トリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro の少なくとも 1 種を生成させる工程を含む。

WO 01/34828 A1



添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## トリペプチドの製造方法

技術分野

本発明は、トリペプチド Val Pro Pro 及び／又は Ile Pro Pro を効率的に製造することができるトリペプチドの製造方法に関する。

背景技術

従来より、特定の配列を有する各種のペプチドが、種々の生理活性を有することが知られている。そのようなペプチドの例として、トリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro が挙げられる。これらのトリペプチドは、乳酸菌発酵乳に見出すことができ、強いアンジオテンシン変換酵素(以下、ACE という)阻害活性を有し、自然発症高血圧ラット(SHR)において強い高血圧抑制作用を有し、また、高血圧患者に対する高血圧抑制効果があることが知られている(J. Dairy Sci. 1995, 78:777-783; J. Dairy Sci. 1995, 78:1253-1257; Am. J. Clin. Nutr. 1996, 64:767-771)。更に、トリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro は、抗ストレス作用を有することも報告されている(特開平 11-100328 号公報)。

トリペプチド Val Pro Pro 及び／又は Ile Pro Pro の製造方法に関しては、乳酸菌発酵法による高効率生産例が報告されている(特開平 11-98978 号公報)。しかし、乳酸菌発酵を行った場合は、乳酸発酵に伴う pH 低下のために発酵は途中で停止し、多くの未分解のカゼインが残る。また、乳酸菌発酵により得られた培養液中には、多くの乳酸が生成するために、各種の製品形態へ加工する際に支障が生じる場合がある。例えば、乾燥粉末に加工する際には、共存する乳酸のために粉末化は困難であり、脱酸処理が必須となる。

そこで、酵素法による生産が考えられる。酵素法では、上記乳酸発酵法と比較して、ペプチド収率の向上、製造工程の安定化、生産工数及び人手等の節減、並びに乳酸生成を伴わない等のメリットが期待される。しかし、トリペプチド Val Pro Pro 及び／又は Ile Pro Pro を生産するにあたり、酵素法によるタンパクの切断においては、Xaa Pro あるいは Pro Xaa(Xaa は任意のアミノ酸を示す)のように Pro を含むアミノ酸の配列の部位で、ペプチダーゼによる分解反応性が極めて低くなってしまう。従って、トリペプチド Val Pro Pro 及び／又は Ile Pro Pro

の酵素法による製造においては、配列 Pro Xaa の切断が困難であり、乳酸発酵法よりも収率を向上させることができていない。例えば、特開平 11-100328 号公報において、トリペプチド Val Pro Pro 及び／又は Ile Pro Pro を得る方法として、乳カゼインをプロテイナーゼで処理し、さらにカルボキシペプチダーゼで処理する方法が例示されているが、具体的な処理方法は記載されておらず、実施例においては乳酸発酵法等の他の方法が記載されているにすぎない。

また、タンパク質をプロテイナーゼ及びペプチダーゼを組み合わせた分解によりトリペプチド Val Pro Pro 及び／又は Ile Pro Pro 以外の有用ペプチドを生産する方法として、 $\gamma$ ゼインより ACE 阻害活性を有するトリペプチド Leu Pro Pro を得る方法(特許 2873327 号)、 $\beta$ カゼインよりペプチド Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Xaa Asn を得る方法(特開平 6-128287 号公報)等も提案されている。しかし、これらも、工業的に有用な製造方法とすることができる程度の収率や安定性が得られるものではなく、実用化されていない。

#### 発明の開示

本発明の目的は、血圧降下剤、抗ストレス剤等として有用なトリペプチド Val Pro Pro 及び／又は Ile Pro Pro を、高収率で、安定的に且つ容易に得ることができ、工業的生産に有用なトリペプチドの製造方法を提供することにある。

本発明によれば、乳カゼインを含む材料を、プロテイナーゼ及びペプチダーゼにより切断してトリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro の少なくとも 1 種を得るトリペプチドの製造方法であって、乳カゼインをプロテイナーゼにより切断し、配列 Val Pro Pro を含み、且つこの配列以外に Pro を含まないペプチド、配列 Ile Pro Pro を含み、且つこの配列以外に Pro を含まないペプチド及びこれらの混合物からなる群より選択される中間体ペプチドを生成させ、前記中間体ペプチドをペプチダーゼにより切断し、トリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro の少なくとも 1 種を生成させる工程を含むトリペプチドの製造方法が提供される。

#### 発明の好ましい実施の形態

本発明のトリペプチドの製造方法では、乳カゼインを含む材料を、特定のプロテイナーゼ及びペプチダーゼにより切断してトリペプチド Val Pro Pro 及び／又は Ile Pro Pro を得る。

前記乳カゼインを含む材料は、トリペプチド含量、素材価格、工業化容易性等を考慮して選択することができ、例えば、獣乳、脱脂乳、脱脂粉乳、乳カゼイン及びその加工品等の、 $\beta$ カゼイン及び $\kappa$ カゼイン等の乳カゼインを多く含む素材等が挙げられる。

乳カゼインのうちアミノ酸配列 Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro を含むのは、特に $\beta$ カゼイン及び $\kappa$ カゼインであるので、前記乳カゼインを含む材料はこれらを含むものが好ましい。

一般的な乳カゼイン中には、 $\beta$ カゼインは25～30重量%、 $\kappa$ カゼインは10～15重量%含まれており、 $\beta$ カゼインのほうが多く含まれている。従って、本発明の製造方法においては、 $\beta$ カゼインを主たる基質源とすることができる。

前記特定のプロテイナーゼは、乳カゼインを切断し特定の間体ペプチドを生成するプロテイナーゼである。

前記特定の中間体ペプチドとは、配列 Val Pro Pro を含み、且つこの配列以外に Pro を含まないペプチド、配列 Ile Pro Pro を含み、且つこの配列以外に Pro を含まないペプチド及びこれらの混合物からなる群より選択されるペプチドである。即ち、配列 Val Pro Pro を含むがそれ以外に Pro を含まないペプチド及び／又は配列 Ile Pro Pro を含むがそれ以外に Pro を含まないペプチドである。具体的には、 $\beta$ カゼインの配列に含まれるペプチド Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr 若しくはこのペプチドからアミノ末端あるいはカルボキシ末端のアミノ酸を1個ずつ除いた Ile Pro Pro に至るまでのペプチドのうち少なくとも1つ(下記配列番号1～15)、又は $\beta$ カゼインの配列に含まれるペプチド Val Val Val Pro Pro Phe Leu Gln 若しくはこのペプチドからアミノ末端あるいはカルボキシ末端のアミノ酸を1個ずつ除いた Val Pro Pro に至るまでのペプチドのうち少なくとも1つ(下記配列番号16～27)等が挙げられる。

Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr(配列番号1)

Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr(配列番号2)

Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr(配列番号3)

Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln(配列番号4)

Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln(配列番号5)

Ile Pro Pro Leu Thr Gln(配列番号6)  
Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr(配列番号7)  
Asn Ile Pro Pro Leu Thr(配列番号8)  
Ile Pro Pro Leu Thr(配列番号9)  
Gln Asn Ile Pro Pro Leu(配列番号10)  
Asn Ile Pro Pro Leu(配列番号11)  
Ile Pro Pro Leu(配列番号12)  
Gln Asn Ile Pro Pro(配列番号13)  
Asn Ile Pro Pro(配列番号14)  
Ile Pro Pro(配列番号15)  
Val Val Val Pro Pro Phe Leu Gln(配列番号16)  
Val Val Pro Pro Phe Leu Gln(配列番号17)  
Val Pro Pro Phe Leu Gln(配列番号18)  
Val Val Val Pro Pro Phe Leu(配列番号19)  
Val Val Pro Pro Phe Leu(配列番号20)  
Val Pro Pro Phe Leu(配列番号21)  
Val Val Val Pro Pro Phe(配列番号22)  
Val Val Pro Pro Phe(配列番号23)  
Val Pro Pro Phe(配列番号24)  
Val Val Val Pro Pro(配列番号25)  
Val Val Pro Pro(配列番号26)  
Val Pro Pro(配列番号27)

前記プロテイナーゼとしては、例えば、パパイン、プロテアーゼA(天野製薬(株)製)、プロテアーゼM(天野製薬(株)製)、プロテアーゼP(天野製薬(株)製)又はこれらの組み合わせ等が挙げられる。

前記ペプチダーゼとしては、カゼインを直接分解することができないが、前記プロテイナーゼにより生成した前記中間体ペプチドを切断し、トリペプチドVal Pro Pro 及び/又は Ile Pro Pro を産生することができる各種のペプチダーゼを用いることができる。例えば、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ等

のエキソ型ペプチダーゼ；オリゴペプチダーゼ等のエンド型ペプチダーゼ又はこれらの混合物等が挙げられる。

前記ペプチダーゼとしては、カルボキシペプチダーゼ及び／又はエンド型ペプチダーゼであって、配列 Val Pro Pro Xaa 及び／又は Ile Pro Pro Xaa における Pro と Xaa との間の結合を切断するものを含むことが特に好ましい。より具体的には、乳カゼインに含まれる配列 Ile Pro Pro Leu 及び／又は Val Pro Pro Phe の Pro Leu 及び／又は Pro Phe の結合を切断できるものが好ましく、この結合に対する特異性を有するペプチダーゼを用いることがさらに好ましい。

前記ペプチダーゼは、併せて用いる前記プロテイナーゼの基質特異性等に応じて適宜選択できる。例えば、プロテイナーゼの基質特異性によっては、アミノペプチダーゼ又はカルボキシペプチダーゼの何れかのみを用いてもよいが、一般には、アミノペプチダーゼ等のペプチドをN末端から切断するペプチダーゼと、カルボキシペプチダーゼ等のペプチドをC末端から切断するペプチダーゼ及び／又はオリゴペプチダーゼとを組み合わせ用いることが好ましい。具体的には、プロテイナーゼとして、パパイン、プロテアーゼA(天野製薬(株)製)、プロテアーゼM(天野製薬(株)製)、プロテアーゼP(天野製薬(株)製)、又はこれらの混合物等を用いる場合は、ペプチダーゼとして、アミノペプチダーゼと、カルボキシペプチダーゼ及び／又はオリゴペプチダーゼとを併用することが好ましい。

前記アミノペプチダーゼとしては、例えば、ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) 由来アミノペプチダーゼ I (シグマ社製)、アエロモナス・プロテオリティカ (*Aeromonas proteolytica*) 由来アミノペプチダーゼ (シグマ社製)、ブタ腎臓細胞質由来ロイシンアミノペプチダーゼ、ブタ腎臓小胞体由来ロイシンアミノペプチダーゼ等が挙げられる。

前記カルボキシペプチダーゼとしては、例えば、カルボキシペプチダーゼ Y (シグマ社製)、カルボキシペプチダーゼ A (シグマ社製)、カルボキシペプチダーゼ B (シグマ社製)、カテプシン G (シグマ社製) 等が挙げられる。

前記ペプチダーゼとしては、上に例示したものの他に、乳酸菌、大腸菌若しくは枯草菌等の微生物、又は動物組織若しくは植物由来の酵素を用いることができる。例えば、乳酸菌ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)

由来のペプチダーゼが用いられる。

ラクトバチルス・ヘルベティカス由来のペプチダーゼは、例えば、乳酸菌ラクトバチルス・ヘルベティカスの培養液から菌体を遠心分離法等により集菌した後に、超音波処理等の細胞摩砕処理により菌体を破砕し、遠心分離を行い沈殿を除き上清を粗酵素抽出液として回収し、粗抽出液を DEAE-sepharose (ファルマシア社製) 等の吸着分離カラムを用いて分画することにより得ることができる。

乳酸菌ラクトバチルス・ヘルベティカス由来のペプチダーゼは、他のペプチダーゼと組み合わせることなしに、前記中間体ペプチドへ作用させ、トリペプチド Ile Pro Pro 及び／又は Val Pro Pro を高収率にて得ることができるが、更に他のアミノペプチダーゼ及び／又はカルボキシペプチダーゼ等のペプチダーゼを併用することもできる。

前記プロテイナーゼ及び前記ペプチダーゼを、前記乳カゼインを含む材料に接触させる順序は、前記乳カゼインを含む材料を、前記プロテイナーゼにより切断して前記中間体ペプチドを得、この中間体ペプチドを前記ペプチダーゼにより切断し、所望のトリペプチドが得られれば特に限定されない。例えば、前記乳カゼインを含む材料に前記プロテイナーゼを接触させて前記中間体ペプチドを得た後に、前記ペプチダーゼを接触させて中間体ペプチドの所望の切断を行う方法 (a)、若しくは前記乳カゼインを含む材料に、前記プロテイナーゼ及び前記ペプチダーゼを同時に接触させ、それぞれの所望の切断を行う方法 (b) 等が挙げられる。

前記方法 (a) を行う場合の前記乳カゼインを含む材料に対する前記プロテイナーゼの添加割合は、1/100～1/10000 が好ましい。また前記プロテイナーゼにより前記乳カゼインを切断し前記中間体ペプチドを生成させる条件は、通常、pH 5～9、温度 20～40℃、好ましくはその酵素の至適 pH 及び至適温度にて、3～24 時間の条件が挙げられる。

前記方法 (a) において、前記中間体ペプチドを得た後、前記ペプチダーゼを接触させる前に、必要に応じて、プロテイナーゼの不活化、未分解蛋白質の除去、中間体ペプチドの濃縮、溶媒の除去等の各種操作を行うことができる。

前記プロテイナーゼの不活化は、通常 60～100℃ の加熱処理により行うことができる。このような不活化を行うことにより、続くペプチダーゼによる切断



を効率的に行うことができる。

前記未分解蛋白質の除去は、例えば、回転数5000～20000回転/分において、3～10分間遠心分離することにより沈殿物を除去することにより行える。

前記中間体ペプチドの濃縮は、疎水性樹脂等を用いて行うことができる。疎水性樹脂として、例えば、プロピオニトリル基等のシアノ基を含む基、フェニル基、又は炭素数1～18のアルキル基等を結合したシリカ系樹脂、具体的には商品名「アンバーライト XAD-7」、「アンバーライト XAD-2」(いずれもオルガノ株式会社製)、Sep-Pak カートリッジ(ウォーターズ社製)等が使用できる。これらの疎水性樹脂は、カラム法又はバッチ法等により中間体ペプチドを吸着した後、例えば、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、アセトニトリル等の極性溶媒等の溶媒を用いて溶出することにより、中間体ペプチドを濃縮することができる。

前記溶媒の除去は、減圧濃縮処理等により行うことができる。

前記方法(a)において、前記中間体ペプチドに前記ペプチダーゼを接触させて所望の切断を行う条件は、通常pH4.0～7.0、好ましくは4.5～6.5、温度25～50℃、好ましくは30～45℃の条件が挙げられる。また、ペプチダーゼとして複数の酵素を用いる場合、用いる酵素ごとに複数に分けて、それぞれの酵素の至適な条件における反応を行っても良い。

前記方法(b)において、前記プロテイナーゼ及び前記ペプチダーゼを、前記乳カゼインを含む材料に同時に接触させた際の所望の切断を行うための条件は、pH4.5～7.0、温度25～50℃が好ましい。

本発明の製造方法において、前記プロテイナーゼ及び前記ペプチダーゼによる切断を行った後の反応混合物は、通常、トリペプチドVal Pro Pro及びIle Pro Proに加えて他のペプチド成分をも含む混合物となる。この反応混合物は、そのまま、又はトリペプチドVal Pro Pro及びIle Pro Proを濃縮精製することにより製品とすることができる。またトリペプチドVal Pro Pro及びIle Pro Proを、塩酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩等の工業上許容される塩を付加したトリペプチドとして、製品とすることもできる。

本発明の製造方法により得られるトリペプチドを含む製品は、そのまま、又は他の食品用又は医薬用の材料と混合し、必要に応じて液体、粉末、顆粒状、錠剤等の形態とし、血圧降下作用及び抗ストレス作用を有する、ヨーグルト、乳性飲料等の乳製品、一般飲食品、特定保健用食品、健康食品、医薬品等とすることができる。

本発明のトリペプチドの製造方法は、血圧降下剤、抗ストレス剤等として有用なトリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro を酵素処理法により、高い収率で安定的に、且つ容易に製造でき、工業的にも極めて価値が高い。

#### 実施例

以下本発明を実験例及び実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

#### 実験例 1-1~1-21 (中間体ペプチドからトリペプチド Ile Pro Pro 及び Val Pro Pro を生成するペプチダーゼ製剤の選択及び至適反応条件の検討)

$\beta$  カゼインのアミノ酸配列に基づいた合成ペプチドであって、アミノ酸配列中に Ile Pro Pro 及び Val Pro Pro を含み、その他の部位に Pro のない表 1 に示すペプチドを化学合成した。これらの合成ペプチドは、全て自動ペプチド合成機 PPSM-8 (島津製作所) により合成した。

次に、表 1 に示す合成ペプチドに対する市販の各種ペプチダーゼ製剤の酵素反応性を調べた。まず、合成ペプチドを、実験例 1-1~1-4、1-10~1-12、1-16 及び 1-21 については 100 mM リン酸緩衝液 pH 5.3 に、他の実験例では 50 mM トリス塩酸 pH 8.0 に、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるよう溶解した。これに表 1 に示す各種ペプチダーゼ製剤を  $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加して 37℃、3 時間反応させた。酵素反応後に、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて分析し、溶出時間 11.0 分に検出されるトリペプチド Val Pro Pro に由来するピーク及び 13.7 分に検出されるトリペプチド Ile Pro Pro に由来するピークを分析した。検出されたピークは分取して、自動ペプチド分析機型式 PPSQ-10 (島津製作所) にてアミノ酸配列分析を行い、分取ピーク中のペプチドのアミノ酸配列が Ile Pro Pro 又は Val Pro Pro であることを確認した。HPLC 分析条件を以下に示す。

ポンプ：L6200 インテリジェントポンプ、L6000 ポンプ(以上、日立製作所製)

検出器：L4000 UV 検出器(日立製作所製)

カラム：マイクロボンドスフェア、5  $\mu$ C18 ( $\Phi$ 3.9x150mm) (ウォーターズ社製)

溶出液：A 液；0.1 重量%トリフルオロ酢酸(TFA)水溶液

B 液；0.1 重量%TFA 含有アセトニトリル

溶出条件：B 液 0% (A 液 100%) から B 液 40% (A 液 60%) の直線濃度勾配溶出 (40 分)、

流速：1 ml / 分

表 1

実験例	合成ペプチド配列	アミノペプチダーゼ	カルボキシペプチダーゼ	IPP 又は VPP ピーク生成の有無
1-1	Asn Ile Pro Pro Leu	A	Y	IPP
1-2	Asn Ile Pro Pro Leu	LC	Y	IPP
1-3	Asn Ile Pro Pro Leu	LM	Y	IPP
1-4	Asn Ile Pro Pro Leu	I	Y	IPP
1-5	Asn Ile Pro Pro Leu	A	B	-
1-6	Asn Ile Pro Pro Leu	LC	B	-
1-7	Asn Ile Pro Pro Leu	LM	B	-
1-8	Asn Ile Pro Pro Leu	I	B	-
1-9	Asn Ile Pro Pro Leu	A	A	-
1-10	Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr	-	Y	IPP
1-11	Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr	I	Y	IPP
1-12	Val Pro Pro Phe	-	Y	VPP
1-13	Val Pro Pro Phe	-	B	-
1-14	Val Pro Pro Phe	-	A	-
1-15	Val Pro Pro Phe	-	G	-
1-16	Val Pro Pro Phe Leu Gln	-	Y	VPP
1-17	Val Val Pro Pro	A	-	VPP
1-18	Val Val Pro Pro	LC	-	VPP
1-19	Val Val Pro Pro	LM	-	VPP
1-20	Val Val Pro Pro	I	-	VPP
1-21	Val Val Val Pro Pro Phe Leu Gln	I	Y	VPP

なお、表 1 中の酵素の略号は、それぞれ以下の酵素を示す。

<アミノペプチダーゼ>

A: アミノペプチダーゼ(シグマ社製)

LC: ロイシンアミノペプチダーゼ、サイトゾール(ブタ腎臓細胞質由来アミノペプチダーゼ、シグマ社製)

LM: ロイシンアミノペプチダーゼ、ミクロゾーマル(ブタ腎臓小胞体由来アミノペプチダーゼ、シグマ社製)

I: アミノペプチダーゼ I(シグマ社製)

<カルボキシペプチダーゼ>

Y: カルボキシペプチダーゼ Y(シグマ社製)

B: カルボキシペプチダーゼ B(シグマ社製)

A: カルボキシペプチダーゼ A(シグマ社製)

G: カテプシン G(シグマ社製)

表1より、いずれのアミノペプチダーゼも、アミノ末端のアミノ酸を、Pro 残基のアミノ酸1残基の手前の配列まで切断除去しうることが認められた。また、カルボキシペプチダーゼとしてカルボキシペプチダーゼYをpH 5.3で作用させた場合、Pro Pro Leu のPro Leu の結合及びPro Pro Phe のPro Phe の結合を、特に良好に切断しうることが認められた。

より長いペプチドである Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr 及び Val Val Val Pro Pro Phe Leu Gln を用いて、アミノペプチダーゼとカルボキシペプチダーゼ Y とで酵素処理を行った場合(実験例1-11及び1-21)も、トリペプチド Ile Pro Pro 又は Val Pro Pro の生成が確認された。すなわち、配列 Ile Pro Pro 又は Val Pro Pro を内部配列に含み、それ以外にはProを含まないカゼイン配列を持つペプチドにアミノペプチダーゼとカルボキシペプチダーゼとを併用して作用させることにより、トリペプチド Ile Pro Pro 及び/又は Val Pro Pro が生成されることが判った。

#### 実験例2(プロテイナーゼによる中間体ペプチドの生成)

カゼイン配列のなかで Ile Pro Pro 及び Val Pro Pro の配列を含む28アミノ酸からなる合成ペプチドを自動ペプチド合成機型式 PPSQ-10により化学合成した。合成ペプチドの配列は以下のとおりとした。

Leu Pro Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr Pro Val Val Val Pro Pro Phe Leu

Gln Pro Glu Val Met Gly·Val Ser Lys (配列番号 28)

この合成ペプチドに市販の各種プロテイナーゼ製剤を作用させ、配列 Ile Pro Pro 又は Val Pro Pro をペプチドのアミノ酸配列に含み、その他の部位に Pro 残基を含まない短鎖ペプチドを生成するプロテイナーゼを探索した。

反応は上記合成ペプチド  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $100 \text{ mM}$  リン酸緩衝液、 $\text{pH } 6.1$ ) に各種酵素を  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、5 時間反応させ、反応液を得た。反応液を逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて分析して、検出されたペプチドのピークを分取し、アミノ酸配列を自動ペプチド分析機型式 PPSQ-10 にて分析した。

その結果、パパイン (シグマ社) を用いた場合に、配列 Val Pro Pro を含むペプチドとして Val Pro Pro Phe Leu が、また配列 Ile Pro Pro を含むペプチドとして Asn Ile Pro Pro Leu Thr 及び Ile Pro Pro Leu Thr が反応液中に生成されていることが確認された。

#### 実験例 3 (ペプチダーゼによる中間体ペプチドの処理反応)

実験例 2 において、プロテイナーゼとしてパパインを用いて得られた反応液を  $100^\circ\text{C}$  で 5 分間加熱処理することにより、プロテイナーゼを不活化処理した。その後、アミノペプチダーゼ A (シグマ社製) を  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加し、 $37^\circ\text{C}$  にて 3 時間反応させた。反応終了後に、 $1 \text{ N}$  塩酸を添加して  $\text{pH } 5.3$  に調製し、カルボキシペプチダーゼ Y を  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加後、 $37^\circ\text{C}$  にて 10 時間反応させた。得られた反応液を実験例 1 と同様の条件にて逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて分析した。その結果、トリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro と思われるペプチドピークが検出されたので、検出ピークを分取し、アミノ酸配列を自動ペプチド分析機 PPSQ-10 にて行い、トリペプチド Ile Pro Pro 及び Val Pro Pro であることを確認した。

#### 実験例 4 (中間体ペプチドからトリペプチド Ile Pro Pro 及び Val Pro Pro を生成する乳酸菌ペプチダーゼのスクリーニング)

乳酸菌ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) に含まれる各種のペプチダーゼ中から、本発明の方法に用いることができるものを、以下に述べる方法によりスクリーニングした。

(ラクトバチルス・ヘルベティカス酵素の抽出、分画)

9重量%の脱脂粉乳を含む乳培地に乳酸菌ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) CM4株(工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)寄託番号: FERM BP-6060、寄託日 1997.8.15)(以下、CM4株という)を接種して、37℃、24時間培養した。このCM4株は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に準拠して上記寄託番号で登録されており、この株が特許されることにより、第三者が入手できない制限が全て取り除かれる。この培養物を、新しい9重量%の乳培地500mlに5重量%接種し、pHを6.5に維持しながら37℃でpHスタット培養を行った。スタット培養開始から5時間後に、クエン酸ナトリウムを終濃度2重量%となるように添加し、室温にて30分間攪拌した。培養液が透明化されたことを確認し、5000gで10分間の遠心分離を行い菌体を回収した。50mMリン酸緩衝液、150mM NaCl、pH6.8で2回洗浄後、20mlの50mMトリス塩酸、pH8.0に懸濁し、超音波破砕機(メーカー大嶽製作所、型式5203)にて菌体を破砕した。15000gで10分間の遠心分離を行い沈殿を除き上清を粗抽出液として回収した。粗抽出液5mlを予め上記トリス緩衝液にて平衡化したDEAE-sepharose ファルマシア社製)1mlに通し、5mlのトリス緩衝液にてカラムを洗浄後、順次50mM、100mM、150mM、200mM、300mM及び500mMのNaClを含む3mlのトリス緩衝液にて洗浄・分画し、表2に示す6つの画分(画分1~6)を得た。

(中間体ペプチドの切断)

中間体ペプチドVal Pro Pro Phe Leuを化学合成した。100mMリン酸緩衝液(pH6.1)にこの合成ペプチドを10μg/mlとなるように溶解した。この溶液と、上記画分1~6のいずれかを、容量比9:1となるよう混合し、37℃で30分間反応させた。反応終了後に、反応液を逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて分析し、トリペプチドVal Pro Proの生成を確認した。トリペプチドVal Pro Pro生成量は、HPLC溶出時間11.0分に検出されるトリペプチドVal-Pro-Proに由来するペプチドピークの高さ(mm)と溶出液量(ml)を乗じて相対的単位として求めた。結果を表2に示す。

表 2

画分	緩衝液中の NaCl 濃度 (mM)	容量 (ml)	VPP 生成量 (相対量)
(洗浄液)	0	5	0
1	50	3	0
2	100	3	6.5
3	150	3	12
4	200	3	45
5	300	3	12
6	500	3	0

その結果、画分 2～5 を用いて反応させた液の分析において、トリペプチド Val-Pro-Pro を生成するペプチダーゼ活性を有するペプチドのピークが認められた。これらの画分には、ペプチド Val Pro Pro Phe Leu からトリペプチド Val Pro Pro を生成する反応に関与するエンド型ペプチダーゼが含まれており、特に、画分 4 には、約  $0.01 \mu\text{g}$  のエンド型ペプチダーゼが含まれていた。

次に、最もペプチダーゼ活性が強かった画分 4 について、他の化学合成した各種の合成中間体ペプチドを基質として用い、上と同様に反応させ、反応液を HPLC 分析し、トリペプチド Ile Pro Pro 又は Val Pro Pro の生成を確認した。その結果、ペプチド Val Pro Pro Phe Leu 及び Val Pro Pro Phe Leu Gln からトリペプチド Val Pro Pro が生成されることが確認された。また、ペプチド Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr 及び Ile Pro Pro Leu Thr からトリペプチド Ile Pro Pro の生成が確認された。結果を表 3 に示す。

表 3

基質ペプチド	生成ペプチド
Val Pro Pro Phe Leu Gln Pro Glu (配列番号 29)	-
Val Pro Pro Phe Leu Gln	Val Pro Pro
Val Pro Pro Phe Leu	Val Pro Pro
Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr	Ile Pro Pro
Ile Pro Pro Leu Thr	Ile Pro Pro

実験例 5 (プロテイナーゼとヘルベティカス由来ペプチダーゼ酵素との組み合わせによるトリペプチド Ile Pro Pro 及び Val Pro Pro の生成)

実験例2で使用したアミノ酸28個から成る合成ペプチド $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $100\text{mM}$ リン酸緩衝液、 $\text{pH}6.1$ )に、表4に示す食品加工用の市販プロテイナーゼ酵素をそれぞれ $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、 $37^\circ\text{C}$ で5時間反応させた。反応終了後に、反応液を $100^\circ\text{C}$ で5分間加熱してプロテイナーゼの不活化処理を行った後に、実験例4で得た画分4と反応させ、HPLC分析にてトリペプチドIle Pro Pro又はVal Pro Proの生成を分析した。各反応液中のトリペプチド生成の有無を表4に示す。

表4

酵素名	起源	トリペプチド Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro 生成の有無
Trypsin (Type I) <sup>1)</sup>	bovine pancreas	無
Type XXIII <sup>1)</sup>	Aspergillus oryzae	無
Pepsin <sup>1)</sup>	Porcine Stomach Mucosa	無
Subtilisin Carlsberg <sup>1)</sup>	Bacillus licheniformis	無
Subtilisin BPN <sup>1)</sup>	Bacillus amyloliquefaciens	無
V8 Protease <sup>1)</sup>	Staphylococcus aureus	無
Papain <sup>1)</sup>	Papaya Latex	有
Protease A <sup>2)</sup>	Aspergillus oryzae	有
Protease M <sup>2)</sup>	Aspergillus oryzae	有
Protease N <sup>2)</sup>	Bacillus subtilis	無
Protease P <sup>2)</sup>	Aspergillus melleus	有
Protease S <sup>2)</sup>	Bacillus sp.	無
ヌクレイシン <sup>3)</sup>	Bacillus subtilis	無
オリエンターゼ ONS <sup>3)</sup>	Aspergillus oryzae	無
オリエンターゼ 10NL <sup>3)</sup>	Bacillus subtilis	無
オリエンターゼ 90N <sup>3)</sup>	Bacillus subtilis	無

1) シグマ社製

2) 天野製薬(株)製

3) 阪急共栄物産(株)製

その結果、プロテイナーゼとして、パパインの他に、プロテアーゼA (Aspergillus oryzae 起源、天野製薬(株)製)、プロテアーゼM (Aspergillus oryzae 起源、天野製薬(株)製)、プロテアーゼP (Aspergillus melleus 起源、天野製薬(株)製)を作用させた場合、実験例4で得た画分4との二段階反応を行うことにより、トリペプチドIle Pro Pro及びVal Pro Proの生成が確認できた。そ



他のプロテイナーゼを用いた場合は、トリペプチド Ile Pro Pro 及び Val Pro Pro の生成は認められなかった。

#### 実施例 1

(カゼインからのトリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro の生成-1)

カゼイン(サンラクト S、太陽化学(株)製) 50 mg を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 10 ml に溶解し、パパイン(シグマ社製) 0.2 mg を添加し、37℃ で 12 時間反応させた。反応終了液を 100℃ で 3 分間熱処理後、急冷し酵素を失活させた。Sep-pak C18 カートリッジ(ウォーターズ社)に反応終了液 10 ml を通した後に、30 容量% アセトニトリル 5 ml で吸着ペプチドを溶出した。溶出ペプチド画分からアセトニトリルを留去乾燥後、1 ml の 50 mM トリス塩酸 (pH 8.0) に溶解し、アミノペプチダーゼ I (天野製薬(株)製)、カルボキシペプチダーゼ Y (天野製薬(株)製) をそれぞれ 0.1 µg/ml の濃度で加え 37℃ で 12 時間反応させた。反応終了液中に含まれるトリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro を定量するために以下の HPLC による方法にて分析した。

(HPLC による Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro の定量法)

サンプルを HPLC の溶離液 (0.3 M NaCl、0.05 重量% TFA 水溶液) にて順次希釈し、合成ペプチドをスタンダードとして用いてトリペプチド Ile Pro Pro 及び Val Pro Pro に相当するピークの高さを測定することで定量分析した。定量分析のための HPLC 分析条件を以下に示す。

使用機種: 日立 L4000 UV デテクター (215 nm)

L6200 インテリジェントポンプ。

L5030 カラムオーヴン (35℃)

分離条件: 流速; 0.5 ml/分

溶離液: 0.3 M NaCl, 0.05 重量% TFA 水溶液

カラム: Asahipak GS320 (Φ 3.9 x 600 mm) (昭和電工(株)製)

その結果、反応終了液中には、カゼイン 50 mg あたり 50 µg のトリペプチド Val Pro Pro と 50 µg のトリペプチド Ile Pro Pro とが含まれていることが判った。カゼインには Val Pro Pro と Ile Pro Pro の配列が主に β カゼインに 1 つずつ存在し、それらの配列から 100% の効率でトリペプチド Ile Pro Pro 及

び Val Pro Pro が生産されたとするとその理論値はカゼイン 1 g あたり約 4 m g であることから、この理論値に対する本実験の回収率は以下の計算式に基づき共に 25 % であった。

$$\text{回収率} = (\text{実測値} / \text{理論値}) \times 100 (\%)$$

$$\text{Val Pro Pro} = 0.05 \text{ m g} / (4 \text{ m g} \times 50 \text{ m g} / 1000 \text{ m g}) \times 100 (\%) = 25 \%$$

$$\text{Ile Pro Pro} = 0.05 \text{ m g} / (4 \text{ m g} \times 50 \text{ m g} / 1000 \text{ m g}) \times 100 (\%) = 25 \%$$

### 実施例 2

(カゼインからのトリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro の生成 - 2)

カゼイン(サンラクト S、太陽化学(株)製) 50 m g を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 10 m l に溶解し、パパイン(シグマ社製) 0.2 m g を添加し、37℃ で 12 時間反応させた。反応終了液を 100℃ で 3 分間熱処理後、急冷し酵素を失活させた。Sep-pak C18 カートリッジ(ウォーターズ社)に反応終了液 10 m l を通した後に、30 容量% アセトニトリル 5 m l で吸着ペプチドを溶出した。溶出ペプチド画分からアセトニトリルを留去乾燥後、実験例 4 で得たラクトバチルス・ヘルペティカス抽出精製酵素画分(画分 4)を 1 m l 添加し、37℃ で 12 時間反応させた。反応終了液中には、カゼイン 50 m g あたりトリペプチド Val Pro Pro 50 μ g (回収率 25%) 及びトリペプチド Ile Pro Pro 19.5 μ g (回収率 7.5%) が含まれていた。

### 実施例 3

(カゼインからのトリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro の生成 - 3)

カゼイン(サンラクト S、太陽化学(株)製) 50 m g を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 10 m l に溶解し、パパイン(シグマ社製) 0.2 m g を添加し、37℃ で 12 時間反応させた。反応終了液を 100℃ で 3 分間熱処理後、急冷し酵素を失活させた。実験例 4 で得たラクトバチルス・ヘルペティカス抽出精製酵素画分(画分 4)を 1 m l 添加し、37℃ で 12 時間反応させた。反応終了液中には、カゼイン 50 m g あたりトリペプチド Val Pro Pro 50 μ g (回収率 25%) 及びトリペプチド Ile Pro Pro 50 μ g (回収率 25%) が含まれていた。

### 実施例 4 ~ 6

(カゼインからのトリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro の生成 - 4)

カゼイン(サンラクトS、太陽化学(株)製) 150mgを50mMリン酸緩衝液(pH6.5) 30mlに溶解した後、10mlづつに分けた。これらに、それぞれプロテアーゼA(実施例4)、プロテアーゼM(実施例5)又はプロテアーゼP(実施例6)(いずれも商品名、天野製薬(株)製)のいずれかを0.2mg添加し、37℃で12時間反応させた。反応終了液を100℃で3分間熱処理後、急冷し酵素を失活させた。実験例4で得たラクトバチルス・ヘルベティカス抽出精製酵素画分(画分4)を1ml添加し、37℃で12時間反応させた。反応終了液中の、カゼイン50mgあたりのトリペプチドVal Pro Pro及びIle Pro Proの含有割合は、実施例4ではそれぞれ40 $\mu$ g(回収率20%)及び45 $\mu$ g(回収率22.5%)であり、実施例5では37 $\mu$ g(回収率18.5%)及び50 $\mu$ g(回収率25%)であり、実施例6では42 $\mu$ g(回収率21%)及び45 $\mu$ g(回収率22.5%)であった。

## 請求の範囲

1) 乳カゼインを含む材料を、プロテイナーゼ及びペプチダーゼにより切断してトリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro の少なくとも1種を得るトリペプチドの製造方法であって、乳カゼインを含む材料を、プロテイナーゼにより切断し、配列 Val Pro Pro を含み、且つこの配列以外に Pro を含まないペプチド、配列 Ile Pro Pro を含み、且つこの配列以外に Pro を含まないペプチド及びこれらの混合物からなる群より選択される中間体ペプチドを生成させ、前記中間体ペプチドをペプチダーゼにより切断し、トリペプチド Val Pro Pro 及び Ile Pro Pro の少なくとも1種を生成させる工程を含むトリペプチドの製造方法。

2) 前記プロテイナーゼが、パパイン、プロテアーゼ A (天野製薬(株)製)、プロテアーゼ M (天野製薬(株)製)、プロテアーゼ P (天野製薬(株)製) 及びこれらの混合物からなる群より選択される請求の範囲 1 記載の製造方法。

3) 中間体ペプチドが、配列番号 1 ~ 27 及びこれらの混合物からなる群より選択される請求の範囲 1 記載の製造方法。

4) 前記ペプチダーゼが、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、オリゴペプチダーゼ及びこれらの混合物からなる群より選択される請求の範囲 1 記載の製造方法。

5) 前記ペプチダーゼが、カルボキシペプチダーゼ及びオリゴペプチダーゼの少なくとも1種であって、配列 Val Pro Pro Xaa 及び Ile Pro Pro Xaa (Xaa は任意のアミノ酸を示す) の少なくとも1種における Pro と Xaa との間の結合を切断するペプチダーゼを含む請求の範囲 1 記載の製造方法。

6) 前記ペプチダーゼが、乳酸菌ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) 生菌体由来のペプチダーゼを含む請求の範囲 1 記載の製造方法。

7) 乳酸菌ラクトバチルス・ヘルベティカスが、CM4 株 (工業技術院生命工学工業技術研究所 寄託番号: FERM BP-6060) である請求の範囲 6 記載の製造方法。

8) 前記乳カゼインを含む材料を、前記プロテイナーゼにより切断して前記中間体ペプチドを生成させた後、前記ペプチダーゼによる切断を行う前に、前記中間体ペプチドを疎水性樹脂により濃縮することを特徴とする請求の範囲 1 記載の製造方法。

## SEQUENCE LISTING

<110>Calpis Co.,Ltd.

<120>トリペプチドの製造方法

<130>4616

<150>JP11-321084

<151>1999-11-11

<160>29

<210>1

<211>9

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>1

Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr

1 5

<210>2

<211>8

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>2

Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr

1 5

<210>3

<211>7

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>3

Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr

1 5

<210>4

2 / 8

&lt;211&gt;8

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;4

Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln

1 5

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;7

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;5

Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln

1 5

&lt;210&gt;6

&lt;211&gt;6

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;6

Ile Pro Pro Leu Thr Gln

1 5

&lt;210&gt;7

&lt;211&gt;7

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;7

Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr

1 5

&lt;210&gt;8

&lt;211&gt;6

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>8

Asn Ile Pro Pro Leu Thr

1 5

<210>9

<211>5

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>9

Ile Pro Pro Leu Thr

1 5

<210>10

<211>6

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>10

Gln Asn Ile Pro Pro Leu

1 5

<210>11

<211>5

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>11

Asn Ile Pro Pro Leu

1 5

<210>12

<211>4

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>12

Ile Pro Pro Leu

1

<210>13

<211>5

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>13

Gln Asn Ile Pro Pro

1

5

<210>14

<211>4

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>14

Asn Ile Pro Pro

1

<210>15

<211>3

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>15

Ile Pro Pro

1

<210>16

<211>8

<212>PRT

<213>Artificial Sequence



&lt;400&gt;16

Val Val Val Pro Pro Phe Leu Gln

1 5

&lt;210&gt;17

&lt;211&gt;7

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;17

Val Val Pro Pro Phe Leu Gln

1 5

&lt;210&gt;18

&lt;211&gt;6

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;18

Val Pro Pro Phe Leu Gln

1 5

&lt;210&gt;19

&lt;211&gt;7

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;19

Val Val Val Pro Pro Phe Leu

1 5

&lt;210&gt;20

&lt;211&gt;6

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;20

Val Val Pro Pro Phe Leu

1 5

<210>21

<211>5

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>21

Val Pro Pro Phe Leu

1 5

<210>22

<211>6

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>22

Val Val Val Pro Pro Phe

1 5

<210>23

<211>5

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>23

Val Val Pro Pro Phe

1 5

<210>24

<211>4

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>24

Val Pro Pro Phe

1

<210>25

<211>5

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>25

Val Val Val Pro Pro

1

5

<210>26

<211>4

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>26

Val Val Pro Pro

1

<210>27

<211>3

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>27

Val Pro Pro

1

<210>28

<211>28

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>28

8 / 8

Leu Pro Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr Pro Val Val Val Pro

1                      5                      10                      15

Pro Phe Leu Gln Pro Glu Val Met Gly Val Ser Lys

20                      25

&lt;210&gt;29

&lt;211&gt;8

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;29

Val Pro Pro Phe Leu Gln Pro Glu

1                      5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07930

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)  
REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 99/16461, A1 (CALPIS CO LTD), 08 April, 1999 (08.04.99)	1-4, 6, 8 5, 7
Y	& JP, 11-100328, A & EP, 1018341, A1	
Y	JP, 10-212245, A (Agency of Industrial Science and Technology), 11 August, 1998 (11.08.98) (Family: none)	1-8
Y	WO, 99/16862, A1 (CALPIS CO LTD), 08 April, 1999 (08.04.99) & JP, 11-98978, A & EP, 1016709, A1	1-8
A	JP, 59-44323, A (Agency of Industrial Science and Technology), 12 March, 1984 (12.03.84) (Family: none)	1-8
A	Journal of Dairy Science, 78(4), 1995 Yasunori Nakamura et al., "Purification and characterization of Angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk", pp.777-783	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
14 February, 2001 (14.02.01)Date of mailing of the international search report  
27 February, 2001 (27.02.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07930

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Journal of Dairy Science, 78(6), 1995 Yasunori Nakamura et al., "Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to Angiotensin I-converting enzyme", pp.1253-1257	1-8
A	Journal of Dairy Science, 81(12), 1998 Amhar Abubakar et al., "Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion", pp.3131-3138	1-8

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P21/06

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P21/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)  
REGISTRY(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 99/16461, A1 (CALPIS CO LTD)	1-4, 6, 8
Y	8. 4月. 1999 (08. 04. 99) & JP, 11-100328, A & EP, 1018341, A1	5, 7
Y	JP, 10-212245, A (工業技術院長) 11. 8月. 1998 (11. 08. 98) ファミリーなし	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 02. 01

国際調査報告の発送日

27.02.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 99/16862, A1 (CALPIS CO LTD) 8. 4月. 1999 (08. 04. 99) & JP, 11-98978, A & EP, 1016709, A1	1-8
A	JP, 59-44323, A (工業技術院長) 12. 3月. 1984 (12. 03. 84) ファミリーなし	1-8
A	Journal of Dairy Science, 78(4), 1995 Yasunori Nakamura et al., "Purification and characterization of Angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk", p. 777-783	1-8
A	Journal of Dairy Science, 78(6), 1995 Yasunori Nakamura et al., "Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to Angiotensin I-converting enzyme", p. 1253-1257	1-8
A	Journal of Dairy Science, 81(12), 1998 Amhar Abubakar et al., "Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion", p. 3131-3138	1-8